

PCT

ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/52, 15/82</b>		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/10074</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. März 1998 (12.03.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/04812  (22) Internationales Anmeldedatum: 4. September 1997 (04.09.97)		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, IL, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: 196 35 917.1 4. September 1996 (04.09.96) DE		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): BASF AK- TIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): LERCHL, Jens [DE/DE]; Im Steg 36, D-68526 Ladenburg (DE). SCHMIDT, Ralf- Michael [DE/DE]; Gräfensteinstrasse 14, D-67434 Neustadt (DE). SCHIFFER, Helmut [DE/DE]; Theodor-Heuss- Strasse 31, D-67112 Mutterstadt (DE). SONNEWALD, Uwe [DE/DE]; Martha-Brautzsch-Strasse 7a, D-06467 Hoym (DE). BADUR, Ralf [DE/DE]; Blechenstedter Strasse 7, D-31137 Hildesheim (DE).			
(74) Anwälte: KINZEBACH, Werner usw.; Reitstötter, Kinzebach & Partner, Postfach 86 06 49, D-81633 München (DE).			
  (54) Title: ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE  (54) Bezeichnung: ADENYLOSUCCINAT SYNTHETASE  (57) Abstract  Expression cartridges are disclosed which confer to plants, plant cells, tissues or parts a resistance against inhibitors of the vegetable adenylosuccinate synthetases. Also disclosed is the use of the expression cartridges in appropriate vectors to transform plants, plant cells, tissues or parts.  (57) Zusammenfassung  Die Erfindung betrifft Expressionskassetten, die in Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen Resistenz gegenüber Inhibitoren pflanzlicher Adenylosuccinat Synthetasen vermitteln sowie die Verwendung der Expressionskassetten in geeigneten Vektoren zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen.			

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Oesterreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GB	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

**Adenylosuccinat Synthetase****Beschreibung**

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft Expressionskassetten, kodierend für nicht-pflanzliche Adenylosuccinat Synthetasen (ADSS), die Pflanzen Resistenz gegenüber Inhibitoren pflanzlicher ADSS vermitteln; Vektoren und Mikroorganismen, enthaltend solche  
10 Expressionskassetten; damit transformierte transgene Pflanzen; die entsprechenden Expressionsprodukte und Nukleinsäuresequenzen; sowie einen Expressions-Kit zur Verwendung bei der Transformation eines pflanzlichen Wirts.
- 15 Pflanzen sind als photoautotrophe Organismen in der Lage, aus Kohlendioxid, Wasser und anorganischen Salzen ihre Zellkomponenten zu synthetisieren. Dieser Prozeß ist nur möglich, indem bio-  
chemische Reaktionen zum Aufbau organischer Substanzen genutzt werden. Insbesondere müssen Pflanzen auch die Nukleotide als  
20 Bestandteile der Nukleinsäuren de novo synthetisieren.

Es ist anzunehmen, daß die effiziente Bildung, Nutzung und Ver-  
teilung der Nukleotide die Zellteilung und das Wachstum einer  
Pflanze stark beeinflussen. Da Pflanzen auf eine funktionierende  
25 de novo Nukleotidbiosynthese angewiesen sind, bietet sich dieser Biosyntheseweg als Ziel für den Einsatz von Herbiziden an. Die komplexen Reaktionen, die die Nukleotidbiosynthese gewährleisten,  
unterteilen sich in Purin- und Pyrimidinbiosynthese.

30 Die Enzymreaktionen der Purinbiosynthese können ausgehend vom Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) in folgende Schritte unterteilt werden:

- Synthese des Pyrimidinringes
- Synthese des Purinringes
- Verzweigung vom IMP zum AMP bzw. GMP

Die Reaktionssequenz von Schritt c) ist in beiliegender Figur 1 schematisch dargestellt.

- 40 Einige der an der Purinbiosynthese beteiligten Enzyme stellen potentielle Angriffspunkte für herbizide Wirkstoffe dar. Eine besondere Stellung nimmt die ADSS ein. Das Enzym katalysiert folgende Reaktion:  
45
- $$\text{IMP} + \text{L-Aspartat} + \text{GTP} \rightleftharpoons \text{Adenylosuccinat} + \text{GDP} + \text{Pi}$$

Die ADSS wurde aus *E. coli* zur Homogenität aufgereinigt (Bass et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys., 256, 335-342), die Kristallstruktur wurde bestimmt (Poland et al., 1993, J. Biol. Chem., 268, 25334-25342) und kinetische Eigenschaften des Enzyms wurden 5 charakterisiert (Kang und Fromm, 1995, J. Biol. Chem., 270, 15539-15544). Das Enzym wurde zudem aus *Dictyostelium discoideum* (Jahngen und Rossomando, 1984, Arch. Biochem. Biophys., 229, 145-154) und Kaninchenmuskel (J. Biol. Chem., 1974, 249(2), 459-464) aufgereinigt. Pflanzliche Adenylosuccinat Synthetase 10 wurde aus Weizenkeimlingen (Hatch, 1967, Phytochemistry, 6, 115-119) sowie aus Mais (Siehl et al., 1996, Plant Physiol., 110, 753-758) für eine Bestimmung der Enzymaktivität isoliert.

Die Adenylosuccinat Synthetase liegt in *E. coli* als Dimer zweier 15 48 kD Polypeptide vor. Für die pflanzliche ADSS liegen bisher keine Daten vor.

Gene, die für ADSS kodieren, wurden bisher aus *Escherichia coli* (EMBL-Accessions-Nummer J04199), *Bacillus subtilis* (J02732), 20 *Haemophilus influenzae* (L46263), *Saccharomyces pombe* (L22185), *Schizosaccharomyces pombe* (M98805), *Dictyostelium discoideum* (M58471), *Homo sapiens* (X65503) und *Mus musculus* (M74495) isoliert. Durch Datenvergleiche lassen sich "expressed-sequence-tags", sogenannte est-Sequenzen, aus *Arabidopsis thaliana* 25 (T42641) und *Oryza sativa* (D15352) mit deutlicher Ähnlichkeit zu den genannten ADSS finden.

Vollständige cDNA-Sequenzen pflanzlicher Adenylosuccinat Synthesen sind zudem aus *Arabidopsis thaliana* und Mais (US-A-5519125) 30 sowie aus Weizen beschrieben worden (WO96/19576).

Zur ADSS-Aktivitätsmessung sind keine Cofaktoren notwendig. Jedoch wurden die Wirkstoffe Hadacidin und Alanosin (Stayton et al., 1983, Curr. Top. Cell. Regul., 22, 103-141) sowie Hydantocidin bzw. dessen Metabolit 5'-Phosphohydantocidin beschrieben 35 (Siehl et al., 1996, Plant Physiol., 110, 753-758), die die Enzymaktivität der pflanzlichen ADSS hemmen.

Der phytotoxische Wirkstoff Hydantocidin wurde aus *Streptomyces hygroscopicus* (Stamm SANK 63584) isoliert (Nakajima et al., 1991, J. Antibiot., 44, 293-300). Es wurde gezeigt, daß das 5'-Phosphohydantocidin als in der Pflanze entstehender Metabolit der eigentliche Inhibitor der ADSS ist (Siehl et al., 1996, Plant Physiol., 110, 753-758). Hydantocidin entfaltet seine toxische Wirkung nur bei Pflanzen, hat eine geringe Säugertoxizität und wirkt nicht auf verschiedene untersuchte Mikroorganismen (Nakajima et al., 1991, J. Antibiot., 44, 293-300). Es wäre wünschenswert,

wenn Wege gefunden werden könnten, das Ansprechen von Pflanzen auf ADSS-Inhibitoren gezielt zu verändern.

Der Erfindung liegt folglich die Aufgabe zugrunde, Mittel bereitzustellen, mit deren Hilfe gezielt das Ansprechen von Pflanzen auf ADSS-Inhibitoren modifiziert werden kann. Insbesondere sollte diese Modifikation auf gentechnischem Wege durchführbar sein.

Diese Aufgabe wird gelöst durch Bereitstellung einer Expressionskassette, enthaltend unter genetischer Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen die kodierende Nukleinsäuresequenz für ein Protein, welches einem pflanzlichen Wirt Resistenz gegenüber Inhibitoren pflanzlicher Adenylosuccinat Synthetase vermittelt.

Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die folgenden Figuren näher erläutert. Dabei zeigt

- Figur 1 die de novo Purinbiosynthese in Pflanzen;
- Figur 2 die Nukleinsäuresäuresequenz der Adenylosuccinat Synthetase aus Escherichia coli, einschließlich der 5'- und 3'-terminalen BamHI-Schnittstellen;
- Figur 3 die Aminosäuresäuresequenz der Adenylosuccinat Synthetase aus Escherichia coli;
- Figur 4 Oligonukleotidsequenzen zur Isolierung der Nukleinsäuresequenz der Adenylosuccinat Synthetase aus Escherichia coli;
- Figur 5 die Nukleinsäuresequenz des Transitpeptides der chloroplastären Transketolase in drei Leserastern;
- Figur 6 den Aufbau der Expressionskassetten und Transformationsvektoren pTP09, pTP10 und pTP11;
- Figur 7 den Aufbau der Expressionskassetten und des Transformationsvektors pTP09-ASS.

Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft Expressionskassetten, welche zur Transformation eines pflanzlichen Wirts geeignet sind und eine kodierende Sequenz enthalten, die dem Wirt Resistenz gegen Inhibitoren pflanzlicher ADSS verleihen.

Resistenz bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Widerstandsfähigkeit gegen die Wirkung pflanzlicher ADSS-Inhibitoren. Sie umfaßt die partielle und, insbesondere, die vollständige Unempfindlichkeit gegenüber diesen Inhibitoren für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Expressionskassetten für einen pflanzlichen Wirt, ausgewählt unter ganzen Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengeweben oder Pflanzen-

teilen, wie z.B. Blättern, Wurzeln, Früchten, bereitgestellt. Insbesondere ist der pflanzliche Wirt ausgewählt unter Kulturpflanzen, davon abgeleiteten Zellen, Geweben, oder Teilen. Als nicht-limitierende Beispiele für geeignete Kulturpflanzen können 5 genannt werden: Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Wein-species.

- 10 Insbesondere bei Kulturpflanzen bietet die vorliegende Erfindung den Vorteil, daß nach Induktion einer selektiven Resistenz der Kulturpflanze gegenüber pflanzlichen ADSS-Inhibitoren diese Inhibitoren als spezifische Herbicide gegen nichtresistente Pflanzen eingesetzt werden können. Als nicht-limitierende Beispiele für 15 derartige Inhibitoren können genannt werden Alanozin, Hadacidin, Hydantocidin sowie Metabolite und funktionell äquivalente Derivate davon. Funktionell äquivalente Derivate pflanzlicher ADSS-Inhibitoren besitzen ein vergleichbares Wirkungsspektrum wie die konkret genannten Substanzen, bei niedrigerer, gleicher oder 20 höherer inhibitorischer Aktivität (z.B. ausgedrückt in g Inhibitor pro Hektar Anbaufläche, erforderlich zur vollständigen Unterdrückung des Wachstums nicht-resistenter Pflanzen).

Gegenstand der Erfindung sind insbesondere Expressionskassetten, 25 deren kodierende Sequenz eine gegen pflanzliche ADSS-Inhibitoren tolerante, nicht-pflanzliche ADSS-Nukleinsäuresequenz oder ein funktionelles Äquivalent davon enthält. Die ADSS-Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein.

- 30 Zur Insertion in eine erfindungsgemäße Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, welche im wesentlichen eine mikrobielle DNA-Sequenz umfassen, die für eine Adenylosuccinat Synthetase aus Mikroorganismen der Genera Escherichia, Bacillus, Haemophilus, Dictyostelium, Saccharomyces oder 35 Schizosaccharomyces und insbesondere aus Escherichia coli, Bacillus subtilis, Haemophilus influenzae, Dictyostelium discoideum, Saccharomyces pombe oder Schizosaccharomyces pombe kodiert. Insbesondere geeignet ist eine ADSS-Sequenz, die im wesentlichen der in Figur 2 (SEQ ID NO:1) dargestellten DNA-Sequenz aus E. coli 40 entspricht.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Resistenz induzieren. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rücküber- 45 setzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die Adenylosuccinat Synthetase-Aktivität aufweisen oder durch in vitro-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind für ADSS

kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer ADSS-Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Codon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Codon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch 5 Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Gegenstand der Erfindung sind auch die zu obigen Nukleinsäuresequenzen und zu den davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen funktional äquivalenten Sequenzen. Funktionelle Äquivalente sind erfundungsgemäß solche Sequenzen, die einander im wesentlichen entsprechen. Darunter versteht man insbesondere Sequenzvarianten, die durch natürliche oder künstliche Mutationen einer ADSS-Sequenz entstanden sind, sofern die gewünschte, zur Aufrechterhaltung des pflanzlichen Metabolismus notwendige, ADSS-Aktivität dabei erhalten bleibt. Die in den pflanzlichen Wirt transformierte exogene ADSS-Aktivität kann also höher, vergleichbar oder etwas geringer sein als diejenige der endogenen pflanzlichen ADSS. Mutationen umfassen Substitutionen, Deletionen, Vertauschungen 20 oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotid- oder Aminosäurereste.

Als Substitutionen werden Austausche von Nukleotiden oder Aminosäuren verstanden. Bevorzugt sind sogenannte stumme oder konervative Austausche. Ein stummer Nukleotidaustausch bewirkt keine Veränderung in der Aminosäuresequenz. Ein konservativer Austausch bewirkt eine Aminosäuresubstitution durch einen Aminosäurerest mit vergleichbaren Eigenschaften, wie z.B. Größe, Ladung, Polarität, Löslichkeit. Beispiele für Aminosäurenpaare mit ähnlichen 30 Eigenschaften sind Glu und Asp, Val und Ile, Ser und Thr.

Unter einer Deletion versteht man erfundungsgemäß das Entfernen wenigstens eines Nukleotids oder wenigstens eines Aminosäurerests. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die DNA-Regionen, die für die Termini des Polypeptids und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen kodieren. Besonders bevorzugt sind erfundungsgemäß DNA-Sequenzen, die für ADSS-Proteine kodieren, die durch N-terminale Verkürzungen um bis zu etwa 100, wie z.B. um 20 bis 100 Aminosäuren, aus der in Figur 3 (SEQ ID 40 NO:2) dargestellten Sequenz entstehen.

Insertionen umfassen erfundungsgemäß Einfügungen von wenigstens einem Nukleotid oder Aminosäurerest in eine der erfundungsgemäßen Sequenzen.

Als weitere erfindungsgemäße funktionell äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein nicht-pflanzliches ADSS-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil da-  
5 von ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit gleicher oder verschiedener enzymatischer Aktivität sein. Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das ADSS an den gewünschten Wirkort leitet.

10

Gegenstand der Erfindung sind somit auch Expressionskassetten, deren kodierende Sequenz für ein ADSS-Fusionsprotein kodiert, wobei Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation der ADSS-Sequenz steuert. Besonders bevorzugt sind  
15 Chloroplasten-spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der ADSS-Sequenz in die Pflanzenchloroplasten (Hauptort der Purinbiosynthese in Pflanzen) vom ADSS-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid abgeleitet von plastidärer Transketolase (TK) oder einem funktionellen  
20 Äquivalent dieses Transitpeptids. Besonders bevorzugt ist eine Expressionskassette, welche eine der in Figur 5 (SEQ ID NOS:3,4,5) dargestellte Transitpeptid-DNA-Sequenz enthält.

Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten umfassen außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende, der kodierenden Sequenz einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende ein Polyadenylierungs-  
30 signal, und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für ADSS und/ oder Transitpeptid operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung der genannten regulativen Elemente derart, daß jedes der regulativen  
35 Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz erfüllen kann.

Als Promotor der erfindungsgemäßen Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremd-  
40 genen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor. Insbesondere bevorzugt ist der 35S CaMV-Promotor aus dem Cauliflower-Mosaik-Virus (Franck et al. (1980) Cell 21, 285-294). Dieser Promotor enthält unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren,  
45 die in ihrer Gesamtheit zu einer konstitutiven Expression des

eingeführten Gens führen (Benfey et al. (1989) EMBO J. 8, 2195-2202).

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignalen aus Agrobacterium tumefaciens, insbesondere dem Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen.

- 10 Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten ADSS-DNA und vorzugsweise einer zwischen Promotor und ADSS-DNA insertierten für ein Chloroplasten-spezifisches Transitpeptid kodierenden DNA sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen  
15 Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Die zur Herstellung erfindungsgemäßer Expressionskassetten erforderliche ADSS-DNA oder -cDNA wird vorzugsweise mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Verfahren zur DNA-Amplifikation mittels PCR sind bekannt, beispielsweise aus Innis et al., PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990). Zweckmäßigerweise können die PCR-erzeugten  
30 DNA-Fragmente durch Sequenzanalyse zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten überprüft werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Expressions-Kit, das mindestens drei Expressionskassetten umfaßt, wobei mindestens zwei  
35 eine variable Region oder Frame-Shift-Sequenz enthalten, die sich durch Insertion oder Deletion, vorzugsweise Insertion, einer nicht durch 3 teilbaren Zahl von Nukleotiden voneinander unterscheiden und somit eine Verschiebung des Leserahmens für eine stromabwärts insertierte Sequenz um ein bzw. zwei Nukleotide bewirken. Das 5'-Ende der Frame-Shift-Sequenz ist mit der Transit-peptidsequenz verknüpft. Die Frame-Shift-Sequenz umfaßt am 3'-Ende eine Restriktionsschnittstelle, in welche z.B. die ADSS-DNA-Sequenz insertiert wird. Durch Bereitstellung von mindestens drei Vektoren, die je eine Expressionskassette des Kits mit  
40 unterschiedlichen Leserahmen für das insertierte Gen enthalten, ist gewährleistet, daß die Fusionskonstrukte aus einer beliebigen DNA-Sequenz und einer für ein Transitpeptid kodierenden DNA-Se-

quenz in drei verschiedenen Leserastern exprimiert werden können, wobei wenigstens eines der Konstrukte zur Expression von funktionellem Genprodukt (wie z.B. ADSS) führt. Die Konstruktionsschemata für einen drei Expressionskassetten enthaltenden erfindungsgemäßen Expressions-Kits der zur Transformation von Pflanzen besonders geeignet ist, werden in beiliegender Figur 6 gezeigt.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung solcher Kits zur Transformation eines pflanzlichen Wirts.

10

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die erfindungsgemäßen Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können, wie z.B. pBin19 (Bevan et al. (1980) Nucl. Acids Res. 12, 8711).

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher rekombinante Vektoren, wie z.B. Plasmide oder Viren, enthaltend wenigstens eine erfindungsgemäße Expressionskassette. Ein besonders bevorzugtes rekombinantes Plasmid mit der Bezeichnung pTP09-ASS enthält das in Figur 7 abgebildete Gen-Konstrukt und verleiht dem 25 damit transformierten pflanzlichen Wirt Resistenz gegen pflanzliche ADSS-Inhibitoren, wie z.B. Hydantocidin.

Zur Transfektion einer Wirtspflanze mit einer ADSS-DNA wird eine erfindungsgemäße Expressionskassette als Insert in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S.71-119 beschrieben.

35

Die erfindungsgemäßen Vektoren können zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen verwendet werden.

Die erfindungsgemäß fusionierten DNA-Konstrukte können auch durch 40 verschiedene andere bekannte Verfahren in pflanzliche Genome transferiert werden. Geeignete Verfahren sind beispielsweise Protoplasten-Transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, Elektroporation, Beschallung oder Mikroinjektion sowie die Transformation intakter Zellen oder Gewebe durch Mikro- oder 45 Makroinjektion in Gewebe oder Embryonen, Gewebeeletroporation, Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, biolistischer Gentransfer und besonders bevorzugt Agrobacterium-Transfor-

mation. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 128-143 sowie in Potrykus (1991) 5 Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42, 205-225) beschrieben.

Vorzugsweise wird das fusionierte Konstrukt in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium 10 tumefaciens zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die 15 Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S-d Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, 20 S. 15-38 und aus S.B. Gelvin, Molecular Genetics of T-DNA Transfer from Agrobacterium to Plants, gleichfalls in Transgenic Plants, S. 49-78. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene 25 Pflanzen regeneriert werden, die in die erfindungsgemäße Expressionskassette integrierte ADSS-DNA exprimieren.

Die Wirksamkeit der transgen exprimierten ADSS kann beispielsweise in vitro durch einen Enzymassay getestet werden, wie in Baugher et al., Biochem. Res. Commun., 94:123-129 (1980); Stayton 30 et al., Curr. Top. Cell. Regul., 22:103-141 (1983); und Bass et al., Arch. Biochem. Biophys., 256:335-342 (1987) beschrieben.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien oder Pilze, welche einen erfindungsgemäßen rekombinanten Vektor enthalten.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einem erfindungsgemäßen Vektor oder Mikroorganismus, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher 40 Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspecies.

45 Die transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile können mit einem Wirkstoff, der die pflanzliche ADSS inhibiert, behandelt werden, wodurch die nicht erfolgreich transformierten

Pflanzen, -zellen, -gewebe oder Pflanzenteile absterben. Beispiele für geeignete Wirkstoffe sind Alanosin, Hadacidin und insbesondere Hydantocidin sowie Metabolite und funktionelle Derivate dieser Verbindungen. Die in die erfindungsgemäßen Expressionskas-  
5 setten insertierte ADSS-DNA kann somit als Selektionsmarker verwendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft somit die Verwendung von Vektoren oder damit transformierten Mikroorganismen zur  
10 Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder Pflanzenteilen insbesondere zur Expression exogener Proteine, Glycoproteine oder Fusionsproteine. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Vermittlung von Resistenz gegen Inhibitoren pflanzlicher ADSS.

15

Gegenstand der Erfindung sind aber auch die erfindungsgemäß erzeugten Expressionsprodukte, insbesondere die Fusionsproteine aus Transitpeptid und Proteinteil mit nicht-pflanzlicher ADSS-Aktivität.

20

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Beispiel 1: PCR-Amplifikation der Escherichia coli Adenylosuccinate Synthetase mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide  
25

Die PCR-Amplifikation der Escherichia coli ADSS wurde in einem DNA-Thermal Cycler der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide (SEQ ID NO:6,7) sind in Figur 4 dargestellt und wurden der publizierten Sequenz entnommen. Die Reaktionsgemische enthielten 8ng/µl genomische DNA aus Escherichia coli, 0,5 µM der entsprechenden Oligonukleotide, 200 µM Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C), 1,5 mM  
35 MgCl<sub>2</sub>) und 0,02 U/µl Taq Polymerase (Perkin Elmer). Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

Anlagerungstemperatur: 45°C, 1 min  
Denaturierungstemperatur: 92°C, 1 min  
40 Elongationstemperatur: 72°C, 1,5 min  
Anzahl der Zyklen: 40

Es resultierte ein Fragment von 1300 Basenpaaren, das in den Vektor pGEM-T (Promega) ligiert wurde. Mit dem Ligationsansatz wurde  
45 E. coli XL-I Blue transformiert und das Plasmid pGEM-ASS erhalten.

**Beispiel 2: Erzeugung pflanzlicher Expressionskassetten**

In das Plasmid pBin19 (Bevan et al. (1980) Nucl. Acids Res. 12, 8711) (kommerziell erhältlich von der Firma Clontech, Palo Alto, CA, USA) wurde ein 35S CaMV Promotor als EcoRI-KpnI-Fragment (entsprechend den Nukleotiden 6909-7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus (Franck et al. (1980) Cell 21, 285) inseriert. Das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmides pTiACH5 (Gielen et al., (1984) EMBO J. 3, 835), Nukleotide 11749-11939, abgeleitet vom Octopin Synthase (OCS)-Gen, wurde als Pvull-HindIII-Fragment isoliert und nach Addition von SphI-Linkern an die Pvull-Schnittstelle zwischen die SphI-HindIII-Schnittstellen des Vektors kloniert. Es entstand das Plasmid pBinAR (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Science 66, 221-230).

**15**

Die cDNA-Sequenz des Transitpeptides (TP) der Transketolase (TK) wurde dem Plasmid pBluescript TK-26 (DE-A-19501906) entnommen und mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide als KpnI-BamHI-Fragment über eine Polymerase-Kettenreaktion in das Plasmid pBinAR inseriert. Durch Variation des verwendeten 3'-spezifischen Oligonukleotides wurden drei Vektoren als pflanzliche Expressionskassetten erhalten (pTP09, pTP10, pTP11, siehe Figuren 5 und 6), die es erlauben, chimäre Genkonstrukte mit der cDNA-Transitsequenz der plastidären Transketolase in drei verschiedenen Leserastern zu erzeugen.

**Beispiel 3: Erstellung einer pflanzlichen Expressionskassette für die Adenylosuccinat Synthetase**

30 Das DNA-Fragment kodierend für die Adenylosuccinat Synthetase wurde als BamHI-Fragment in den Vektor pTP09 kloniert. Es resultierte das Plasmid pTP09-ASS (siehe Figur 7). Durch Fusion des Transitpeptides (TP/TK) mit der Adenylosuccinat Synthetase wurde der Import des Proteins in den Chloroplasten gewährleistet.

**35****Beispiel 4: Sequenzanalyse rekombinanter DNA**

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzer der Firma Pharmacia nach der 40 Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase-Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

**45**

Beispiel 5: Herstellung transgener Tabakpflanzen, die eine mikrobielle Adenylosuccinat Synthetase im Chloroplasten enthalten

5 Das Plasmid pTP09-ASS wurde in Agrobacterium tumefaciens C58C1:pGV2260 transformiert. Die Transformation von Agrobacterium tumefaciens wurde entsprechend der Methode von Höfgen und Willmitzer (Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877) ausgeführt. Die Anzucht der Agrobakterien erfolgte in YEB-Medium (Vervliet et al., J. Gen. Virol. (1975) 26, 33). Zur Transformation von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) wurde eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtkultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium ((1962) Physiol. Plant. 15, 473) mit 2% Saccharose (2MS-Medium) benutzt. Blattscheiben steriler Pflanzen (zu je ca. 1 cm<sup>2</sup> wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5 bis 10 Minuten inkubiert. Es folgte eine 2-tägige Inkubation in Dunkelheit bei 25°C auf 2MS-Medium mit 0,8% Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde nach 2 Tagen mit 16 Stunden Licht/ 8 Stunden Dunkelheit weitergeführt 15 und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin, 1 mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0,2 mg/l Naphthylessigsäure und 1,6 g/l Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2% Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8% Bacto-Agar überführt.

20

Bei einer zweiten Transformation wurde entsprechend vorgegangen, jedoch wurde als Antibiotikum 220 mg/l Hydantocidin zugegeben.

Beispiel 6: Analyse vom Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben

30 Zur genaueren Untersuchung der Expression wurde die Gesamt-RNA von Tabakpflanzen, wie bei Logemann et al. (Anal. Biochem. (1987) 163, 21) beschrieben, isoliert. Für die Analyse wurden jeweils 20 µg RNA in einem Formaldehyd-haltigen 1,5%igen Agarosegel aufge-35 trennt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der RNA-Moleküle wurde die RNA mittels Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen. Der Nachweis spezifischer Transkripte wurde, wie bei Amasino (Anal. Biochem. (1986) 152, 304) beschrieben, durchgeführt. Die als Sonde eingesetzten cDNA-Fragmente wurden mit einem 40 Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer, Mannheim) radioaktiv markiert.

Beispiel 7: Enzymassay von aus transgenen Tabakpflanzen isolierter Adenylosuccinat Synthetase

Der Testansatz beinhaltete 14 mM Tris-HCl pH 8,3; 6 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 0,4 mM IMP; 0,1 mM GTP; 0,5 mM Phosphoenolpyruvat; 0,1 mM ATP; 2 U/ml Pyruvatkina<sup>se</sup>se; 3 mM Aspartat sowie in einem 1 ml Testansatz 10 bis 100 µl Enzympräparat. Es erfolgte eine Inkubation von 5 bis 20 min bei 25°C in Anwesenheit oder Abwesenheit des Inhibitors Hydantocidin und anschließende Messung bei 280 nm (Absorption von Adenylosuccinat) am Zweistrahlphotometer gegen einen Ansatz ohne Aspartat als Leerwert. Die rekombinante ADSS zeigte keine Inhibierung durch Hydantocidin.

Beispiel 8: Testung Hydantocidin-resistenter Tabakpflanzen  
15

Mit dem Plasmid pTP09-ASS transformierte Tabakpflanzen wurden in Gewebekultur auf 2MS-Medium mit 0,8% Bacto Agar, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin angezogen und axiale Sprosse auf entsprechendes Medium mit 220 mg/l Hydantocidin überführt. Nichttransformierte Pflanzen starben innerhalb weniger Wochen ab, während resistente Pflanzen weiterwuchsen.

25

30

35

40

45

## SEQUENZPROTOKOLL

## 5 (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER:  
(A) NAME: BASF Aktiengesellschaft  
(B) STRASSE: --  
(C) ORT: Ludwigshafen  
(E) LAND: Germany  
(F) POSTLEITZAHL: D-67056
- 10 (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Adenylosuccinat Synthetase
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 7
- (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:  
(A) DATENTRÄGER: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## 20 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

- 20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 1311 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- 25 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:  
(A) ORGANISMUS: Escherichia coli
- 30 (ix) MERKMAL:  
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature  
(B) LAGE: 1..6  
(D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "BamHI Schnittstelle"
- (ix) MERKMAL:  
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
(B) LAGE: 7..1302  
(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "Adenylosuccinate Synthetase"
- 35 (ix) MERKMAL:  
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature  
(B) LAGE: 1303..1305  
(D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "Stop codon"
- 40 (ix) MERKMAL:  
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature  
(B) LAGE: 1306..1311  
(D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "BamHI Schnittstelle"
- 45 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

	GGATCC ATG GGT AAC AAC GTC GTC GTA CTG GGC ACC CAA TCG GGT GAC Met Gly Asn Asn Val Val Val Leu Gly Thr Gln Trp Gly Asp	48
5	1 5 10	
	GAA GGT AAA GGT AAG ATC GTC GAT CTT CTG ACT GAA CGG GCT AAA TAT Glu Gly Lys Gly Lys Ile Val Asp Leu Leu Thr Glu Arg Ala Lys Tyr	96
	15 20 25 30	
10	GTT GTA CGC TAC CAG GGC GGT CAC AAC GCA GGC CAT ACT CTC GTA ATC Val Val Arg Tyr Gln Gly His Asn Ala Gly His Thr Leu Val Ile	144
	35 40 45	
	AAC GGT GAA AAA ACC GTT CTC CAT CTT ATT CCA TCA GGT ATT CTC CGC Asn Gly Glu Lys Thr Val Leu His Leu Ile Pro Ser Gly Ile Leu Arg	192
	50 55 60	
15	GAG AAT GTA ACC AGC ATC ATC GGT AAC GGT GTT GTG CTG TCT CCG GCC Glu Asn Val Thr Ser Ile Ile Gly Asn Gly Val Val Leu Ser Pro Ala	240
	65 70 75	
	GCG CTG ATG AAA GAG ATG AAA GAA CTG GAA GAC CGT GGC ATC CCC GTT Ala Leu Met Lys Glu Met Lys Glu Leu Glu Asp Arg Gly Ile Pro Val	288
	80 85 90	
20	CGT GAG CGT CTG CTG CTG TCT GAA GCA TGT CCG CTG ATC CTT GAT TAT Arg Glu Arg Leu Leu Leu Ser Glu Ala Cys Pro Leu Ile Leu Asp Tyr	336
	95 100 105 110	
	CAC GTT GCG CTG GAT AAC GCG CGT GAG AAA GCG CGT GGC GCG AAA GCG His Val Ala Leu Asp Asn Ala Arg Glu Lys Ala Arg Gly Ala Lys Ala	384
	115 120 125	
25	ATC GGC ACC ACC GGT CGT GGT ATC GGG CCT GCT TAT GAA GAT AAA GTA Ile Gly Thr Thr Gly Arg Gly Ile Gly Pro Ala Tyr Glu Asp Lys Val	432
	130 135 140	
	GCA CGT CGC GGT CTG CGT GTT GGC GAC CTT TTC GAC AAA GAA ACC TTC Ala Arg Arg Gly Leu Arg Val Gly Asp Leu Phe Asp Lys Glu Thr Phe	480
	145 150 155	
30	GCT GAA AAA CTG AAA GAA GTG ATG GAA TAT CAC AAC TTC CAG TTG GTT Ala Glu Lys Leu Lys Glu Val Met Glu Tyr His Asn Phe Gln Leu Val	528
	160 165 170	
	AAC TAC TAC AAA GCT GAA GCG GTT GAT TAC CAG AAA GTT CTG CAT GAT Asn Tyr Tyr Lys Ala Glu Ala Val Asp Tyr Gln Lys Val Leu Asp Asp	576
35	175 180 185 190	
	ACG ATG GCT GTT GCC GAC ATC CTG ACT TCT ATG GTG GTT GAC GTT TCT Thr Met Ala Val Ala Asp Ile Leu Thr Ser Met Val Val Asp Val Ser	624
	195 200 205	
40	GAC CTG CTC GAC CAG GCG CGT CAG CGT GGC GAT TTC GTC ATG TTT GAA Asp Leu Leu Asp Gln Ala Arg Gln Arg Gly Asp Phe Val Met Phe Glu	672
	210 215 220	
	GGT GCG CAG GGT ACG CTG CTG GAT ATC GAC CAC GGT ACT TAT CCG TAC Gly Ala Gln Gly Thr Leu Leu Asp Ile Asp His Gly Thr Tyr Pro Tyr	720
	225 230 235	
45	GTA ACT TCT TCC AAC ACC ACT GCT GGT GGC GTG GCG ACC GGT TCC GGC Val Thr Ser Ser Asn Thr Thr Ala Gly Gly Val Ala Thr Gly Ser Gly	768
	240 245 250	

	CTG GGC CCG CGT TAT GTT GAT TAC GTT CTG GGT ATC CTC AAA GCT TAC Leu Gly Pro Arg Tyr Val Asp Tyr Val Leu Gly Ile Leu Lys Ala Tyr 255 260 265 270	816
5	TCC ACT CGT GTA GGT GCA GGT CCG TTC CCG ACC GAA CTG TTT GAT GAA Ser Thr Arg Val Gly Ala Gly Pro Phe Pro Thr Glu Leu Phe Asp Glu 275 280 285	864
	ACT GGC GAG TTC CTC TGC AAG CAG GGT AAC GAA TTC GGC GCA ACT ACG Thr Gly Glu Phe Leu Cys Lys Gln Gly Asn Glu Phe Gly Ala Thr Thr 290 295 300	912
10	GGG CGT CGT CGT CGT ACC GGC TGG CTG GAC ACC GTT GCC GTT CGT CGT Gly Arg Arg Arg Arg Thr Gly Trp Leu Asp Thr Val Ala Val Arg Arg 305 310 315	960
	GCG GTA CAG CTG AAC TCC CTG TCT GGC TTC TGC CTG ACT AAA CTG GAC Ala Val Gln Leu Asn Ser Leu Ser Gly Phe Cys Leu Thr Lys Leu Asp 320 325 330	1008
15	GTT CTG GAT GGC CTG AAA GAG GTT AAA CTC TGC GTG GCT TAC CGT ATG Val Leu Asp Gly Leu Lys Glu Val Lys Leu Cys Val Ala Tyr Arg Met 335 340 345 350	1056
20	CCG GAT GGT CGC GAA GTG ACT ACC ACT CCG CTG GCA GCT GAC GAC TGG Pro Asp Gly Arg Glu Val Thr Thr Pro Leu Ala Ala Asp Asp Trp 355 360 365	1104
	AAA GGT GTA GAG CCG ATT TAC GAA ACC ATG CCG GGC TGG TCT GAA TCC Lys Gly Val Glu Pro Ile Tyr Glu Thr Met Pro Gly Trp Ser Glu Ser 370 375 380	1152
25	ACC TTC GGC GTG AAA GAT CGT AGC GGC CTG CCG CAG GCG GCG CTG AAC Thr Phe Gly Val Lys Asp Arg Ser Gly Leu Pro Gln Ala Ala Leu Asn 385 390 395	1200
	TAT ATC AAG CGT ATT GAA GAG CTG ACT GGT GTG CCG ATC GAT ATC ATC Tyr Ile Lys Arg Ile Glu Glu Leu Thr Gly Val Pro Ile Asp Ile Ile 400 405 410	1248
30	TCT ACC GAT CCG GAT CGT ACT GAA ACC ATG ATT CTG CGC GAC CCG TTC Ser Thr Asp Pro Asp Arg Thr Glu Thr Met Ile Leu Arg Asp Pro Phe 415 420 425 430	1296
	GAC GCG TAACGGATCC Asp Ala	1311
35	(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:	

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 432 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:
- Met Gly Asn Asn Val Val Val Leu Gly Thr Gln Trp Gly Asp Glu Gly  
1 5 10 15
- Lys Gly Lys Ile Val Asp Leu Leu Thr Glu Arg Ala Lys Tyr Val Val  
20 25 30

	Arg Tyr Gln Gly Gly His Asn Ala Gly His Thr Leu Val Ile Asn Gly			
	35	40	45	
5	Glu Lys Thr Val Leu His Leu Ile Pro Ser Gly Ile Leu Arg Glu Asn			
	50	55	60	
	Val Thr Ser Ile Ile Gly Asn Gly Val Val Leu Ser Pro Ala Ala Leu			
	65	70	75	80
	Met Lys Glu Met Lys Glu Leu Glu Asp Arg Gly Ile Pro Val Arg Glu			
	85	90	95	
10	Arg Leu Leu Leu Ser Glu Ala Cys Pro Leu Ile Leu Asp Tyr His Val			
	100	105	110	
	Ala Leu Asp Asn Ala Arg Glu Lys Ala Arg Gly Ala Lys Ala Ile Gly			
	115	120	125	
15	Thr Thr Gly Arg Gly Ile Gly Pro Ala Tyr Glu Asp Lys Val Ala Arg			
	130	135	140	
	Arg Gly Leu Arg Val Gly Asp Leu Phe Asp Lys Glu Thr Phe Ala Glu			
	145	150	155	160
	Lys Leu Lys Glu Val Met Glu Tyr His Asn Phe Gln Leu Val Asn Tyr			
20	165	170	175	
	Tyr Lys Ala Glu Ala Val Asp Tyr Gln Lys Val Leu Asp Asp Thr Met			
	180	185	190	
	Ala Val Ala Asp Ile Leu Thr Ser Met Val Val Asp Val Ser Asp Leu			
	195	200	205	
25	Leu Asp Gln Ala Arg Gln Arg Gly Asp Phe Val Met Phe Glu Gly Ala			
	210	215	220	
	Gln Gly Thr Leu Leu Asp Ile Asp His Gly Thr Tyr Pro Tyr Val Thr			
	225	230	235	240
	Ser Ser Asn Thr Thr Ala Gly Gly Val Ala Thr Gly Ser Gly Leu Gly			
30	245	250	255	
	Pro Arg Tyr Val Asp Tyr Val Leu Gly Ile Leu Lys Ala Tyr Ser Thr			
	260	265	270	
	Arg Val Gly Ala Gly Pro Phe Pro Thr Glu Leu Phe Asp Glu Thr Gly			
	275	280	285	
35	Glu Phe Leu Cys Lys Gln Gly Asn Glu Phe Gly Ala Thr Thr Gly Arg			
	290	295	300	
	Arg Arg Arg Thr Gly Trp Leu Asp Thr Val Ala Val Arg Arg Ala Val			
	305	310	315	320
40	Gln Leu Asn Ser Leu Ser Gly Phe Cys Leu Thr Lys Leu Asp Val Leu			
	325	330	335	
	Asp Gly Leu Lys Glu Val Lys Leu Cys Val Ala Tyr Arg Met Pro Asp			
	340	345	350	
	Gly Arg Glu Val Thr Thr Pro Leu Ala Ala Asp Asp Trp Lys Gly			
45	355	360	365	

	Val	Glu	Pro	Ile	Tyr	Glu	Thr	Met	Pro	Gly	Trp	Ser	Glu	Ser	Thr	Phe
	370					375						380				
5	Gly	Val	Lys	Asp	Arg	Ser	Gly	Leu	Pro	Gln	Ala	Ala	Leu	Asn	Tyr	Ile
	385					390					395				400	
	Lys	Arg	Ile	Glu	Glu	Leu	Thr	Gly	Val	Pro	Ile	Asp	Ile	Ile	Ser	Thr
				405						410				415		
	Asp	Pro	Asp	Arg	Thr	Glu	Thr	Met	Ile	Leu	Arg	Asp	Pro	Phe	Asp	Ala
					420					425				430		

(3) ANGABEN ZU SEO ID NO: 3:

- |    |  |     |
|----|--|-----|
|    | (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  |     |
|    | (A) LÄNGE: 258 Basenpaare  |     |
|    | (B) ART: Nucleotid   |     |
|    | (C) STRANGFORM: Einzelstrang                                       |     |
|    | (D) TOPOLOGIE: linear  |     |
| 15 | (iii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA                                       |     |
|    | (iii) HYPOTHETISCH: NEIN   |     |
| 20 | (iv) ANTISENSE: NEIN   |     |
|    | (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:  |     |
|    | (I) ORGANELLE: Chloroplast   |     |
|    | (ix) MERKMAL:  |     |
|    | (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature                                   |     |
|    | (B) LAGE:1..6  |     |
| 25 | (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "KpnI Schnittstelle"               |     |
|    | (ix) MERKMAL:  |     |
|    | (A) NAME/SCHLÜSSEL: transit_peptide                                |     |
|    | (B) LAGE:7..252  |     |
| 30 | (ix) MERKMAL:  |     |
|    | (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature                                   |     |
|    | (B) LAGE:253..259  |     |
|    | (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "BamHI Schnittstelle"              |     |
|    | (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:                            |     |
| 35 | GGTACCATGG CGTCCTCTTC TTCTCTCACT CTCTCTCAAG CTATCCTCTC TCGTTCTGTC  | 60  |
|    | CCTCGCCATG GCTCTGCCTC TTCTTCTCAA CTTTCCCCTT CTCTCTCTCAC TTTTTCGGGC | 120 |
|    | CTTAAATCCA ATCCCAATAT CACCACCTCC CGCCGCCGTA CTCCCTCCTC CGCCGCCGCC  | 180 |
|    | GCCGCCGTCG TAAGGTCAAC GGCGATTCTGT GCCTCAGCTG CAACCGAAC CATAGAGAAA  | 240 |
| 40 | ACTGAGACTG CGGGATCC  | 258 |
|    | (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:                                       |     |
|    | (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  |     |
|    | (A) LÄNGE: 260 Basenpaare  |     |
|    | (B) ART: Nucleotid   |     |
|    | (C) STRANGFORM: Einzelstrang                                       |     |
| 45 | (D) TOPOLOGIE: linear  |     |

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- 5 (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:  
(I) ORGANELLE: Chloroplast
- 10 (ix) MERKMAL:  
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature  
(B) LAGE:1..6  
(D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "KpnI Schnittstelle"
- (ix) MERKMAL:  
(A) NAME/SCHLÜSSEL: transit\_peptide  
(B) LAGE:7..252
- 15 (ix) MERKMAL:  
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature  
(B) LAGE:253..254  
(D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "frame shift insert"
- (ix) MERKMAL:  
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature  
20 (B) LAGE:255..260  
(D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "BamHI Schnittstelle"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:
- |   |     |
|---|-----|
| 25 GGTACCATGG CGTCTTCCTTC TTCTCTCACT CTCTCTCAAG CTATCCTCTC TCGTTCTGTC | 60  |
| CCTCGCCATG GCTCTGCCCTC TTCTCTCAA CTTTCCCCCTT CTTCTCTCAC TTTTCCGGC     | 120 |
| CTTAAATCCA ATCCCAATAT CACCACCTCC CGCCGCCGTA CTCTCTCTC CGCCGCCGCC      | 180 |
| GCCGCCGTG TAAGGTCACC GCCGATTGCT GCCTCAGCTG CAACCGAAAC CATAGAGAA       | 240 |
| 30 ACTGAGACTG CGCTGGATCC  | 260 |
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:
- 35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 259 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- 40 (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:  
(I) ORGANELLE: Chloroplast
- (ix) MERKMAL:  
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature  
(B) LAGE:1..6  
45 (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "KpnI Schnittstelle"

(ix) MERKMALE:  
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: transit\_peptide  
 (B) LAGE: 7..252

5 (ix) MERKMALE:  
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature  
 (B) LAGE: 253  
 (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "Frame shift insert"

10 (ix) MERKMALE:  
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature  
 (B) LAGE: 254..259  
 (D) SONSTIGE ANGABEN:/function= "BamHI Schnittstelle"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GGTACCATGG CGTCTTCCTTC TTCTCTCACT CTCTCTCAAG CTATCCTCTC TCGTTCTGTC	60
15 CCTCGCCATG GCTCTGCCTC TTCTCTCAA CTTTCCCCCTT CTTCTCTCAC TTTTTCCGGC	120
CTTAAATCCA ATCCCAATAT CACCACCTCC CGCCGCCGTA CTCCTTCCTC CGCCGCCGCC	180
GCCGCCGTG TAAGGTCAAC GGCGATTCTGT GCCTCAGCTG CAACCGAAC CATAGAGAAA	240
ACTGAGACTG CGGGGATCC	259

20 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 33 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetic"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

AAGGATCCAT GGGTAACAAAC GTCGTCGTAC TGG	33
---------------------------------------	----

35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 23 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear

40 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetic"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

45

(x1) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

23

5 AAGGATCCCG TACCAAGATT ACG

10

15

20

25

30

35

40

45

## Patentansprüche

1. Expressionskassette, enthaltend unter genetischer Kontrolle  
5 regulativer Nukleinsäuresequenzen die kodierende Nuklein-  
säuresequenz für ein Protein, welches einem pflanzlichen Wirt  
Resistenz gegenüber Inhibitoren pflanzlicher Adenylosuccinat  
Synthetase vermittelt.
- 10 2. Expressionskassette nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß der Inhibitor ausgewählt ist unter Alanosin, Hadacidin,  
Hydantocidin sowie Metaboliten und funktionell äquivalenten  
Derivaten davon.
- 15 3. Expressionskassette nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß die kodierende Nukleinsäuresequenz für ein  
Protein kodiert, das nicht-pflanzliche Adenylosuccinat Syn-  
thetase oder ein funktionelles Äquivalent davon umfaßt.
- 20 4. Expressionskassette nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet,  
daß die nicht-pflanzliche Adenylosuccinat Synthetase von ei-  
ner mikrobiellen Adenylosuccinat Synthetase abgeleitet ist.
5. Expressionskassette nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet,  
25 daß die mikrobielle Adenylosuccinat Synthetase aus Escheri-  
chia coli, Bacillus subtilis, Haemophilus influenzae, Dicty-  
stelium discoideum, Saccharomyces pombe oder Schizosaccharo-  
myces pombe abgeleitet ist.
- 30 6. Expressionskassette nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, daß die kodierende Nukleinsäurese-  
quenz für ein Protein enthaltend eine Aminosäuresequenz gemäß  
SEQ ID NO:2 oder ein funktionelles Äquivalent davon kodiert  
oder eine Nukleinsäuresequenz von Rest + 7 bis + 1305 gemäß  
35 SEQ ID NO:1 oder ein funktionelles Äquivalent davon umfaßt.
7. Expressionskassette nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, daß die kodierende Nukleinsäure-  
sequenz außerdem für ein Chloroplasten-spezifisches Transit-  
40 peptid kodiert.
8. Expressionskassette nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet,  
daß die kodierende Nukleinsäuresequenz für das Transitpeptid  
plastidärer Transketolase oder ein funktionelles Äquivalent  
45 davon kodiert.

9. Rekombinanter Vektor, umfassend eine Expressionskassette nach einem der Ansprüche 1 bis 8.
10. Vektor nach Anspruch 9, der im wesentlichen dem Vektor  
5 pTP09-ASS entspricht.
11. Mikroorganismus, enthaltend einen rekombinanten Vektor nach Anspruch 9 oder 10.
- 10 12. Mikroorganismus nach Anspruch 11 aus der Gattung Agrobacterium und insbesondere der Art Agrobacterium tumefaciens.
13. Verwendung eines Vektors nach einem der Ansprüche 9 und 10 oder eines Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 11 und 12  
15 zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen.
14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei den Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen Resistenz gegenüber Inhibitoren  
20 pflanzlicher Adenylosuccinat Synthetase vermittelt wird.
15. Verwendung einer kodierenden Nukleinsäuresequenz gemäß der Definition in einem der Ansprüche 1 bis 6 als Selektions- oder Markergen in Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen.  
25
16. Transgene Pflanze, transformiert mit einem Vektor gemäß einem der Ansprüche 9 und 10 oder mit einem Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 11 und 12, oder transgene Zellen, Gewebe,  
30 Teile oder transgenes Vermehrungsgut davon.
17. Transgene Pflanze nach Anspruch 16, ausgewählt unter Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Kartoffel, Tabak, Tomate,  
35 Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspecies.
18. Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen nach einem der Ansprüche 16 und 17, dadurch gekennzeichnet, daß man  
40 Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile oder Protoplasten mit einem Vektor gemäß einem der Ansprüche 9 und 10 oder mit einem Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 11 und 12 transformiert, die transformierten Zellen, Gewebe, Pflanzen-teile oder Protoplasten in einem Wachstumsmedium kultiviert  
45 und gegebenenfalls aus der Kultur Pflanzen regeneriert.

19. Expressionsprodukt einer in den Ansprüchen 1 bis 8 definierten Expressionskassette.
20. Expressionsprodukt nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet,  
5 daß es im wesentlichen eine Aminosäuresequenz von Aminosäure  
+ 1 bis + 432 gemäß SEQ ID NO:2 oder ein funktionelles Äquivalent davon umfaßt.
21. Expressions-Kit für die Expression eines Fremdgens in einem  
10 pflanzlichen Wirt, das mindestens drei Expressionskassetten umfaßt, wobei mindestens zwei Expressionskassetten davon unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen jeweils eine Frame-Shift-Sequenz enthalten, die sich von einander durch Insertion oder Deletion einer nicht durch 3  
15 teilbaren Anzahl von Nukleotiden unterscheiden und den Leserahmen für eine stromabwärts liegende kodierende Nukleinsäuresequenz um ein bzw. zwei Nukleotide verschieben.
22. Expressions-Kit nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß  
20 jede Expressionskassette eine kodierende Sequenz für ein Chloroplasten-spezifisches Transitpeptid enthält und die gegebenenfalls enthaltene Frame-Shift-Sequenz auf deren 3'-Ende folgt.
- 25 23. Expressions-Kit nach Anspruch 22, enthaltend Expressions-  
kassetten, die je eine der folgenden Nukleotidsequenzen:  
SEQ ID NO:3 von Nukleinsäurerest +7 bis +252  
SEQ ID NO:4 von Nukleinsäurerest +7 bis +254  
SEQ ID NO:5 von Nukleinsäurerest +7 bis +253  
30 oder ein funktionelles Äquivalent davon, enthalten.
24. Verwendung eines Expressions-Kits nach einem der Ansprüche 21 bis 23 zur Transformation eines pflanzlichen Wirts.

35

40

45

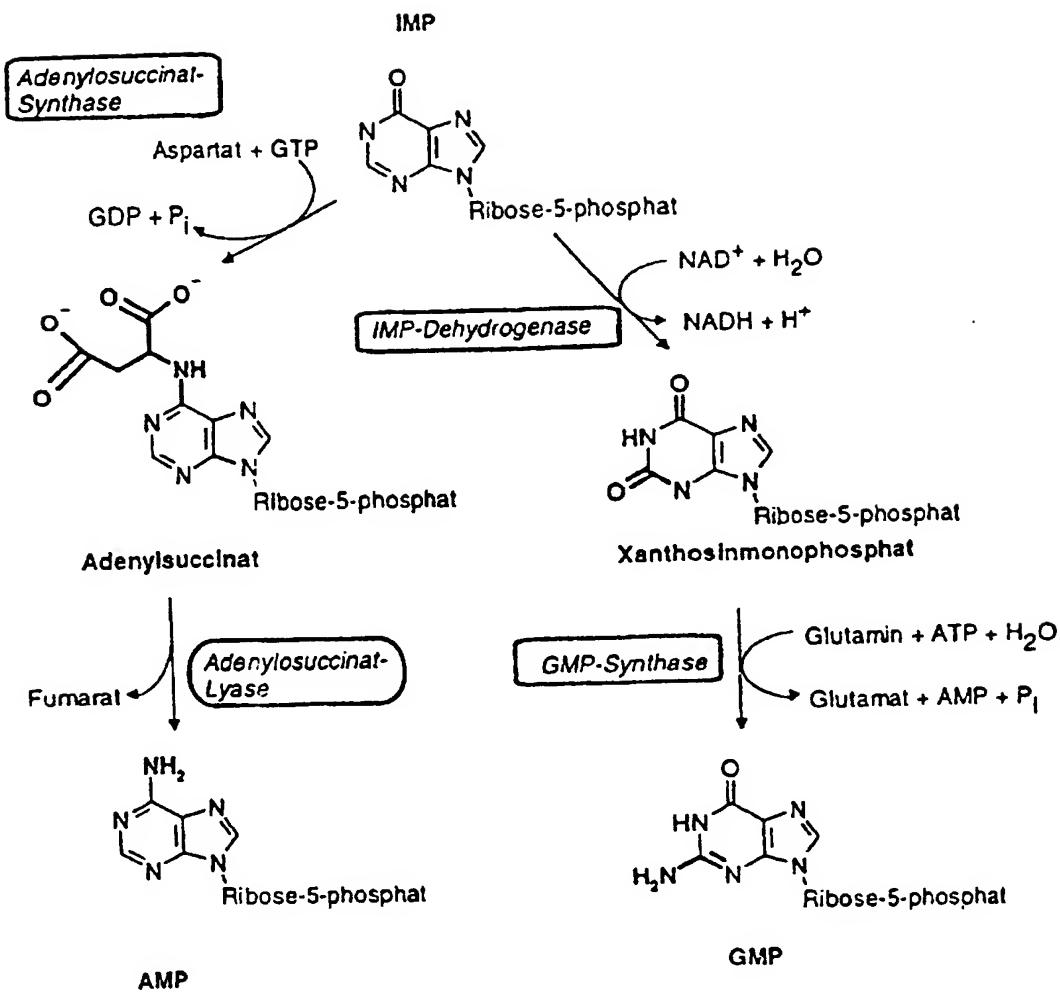


Fig. 1

2/5

BamHI-

ggatccATGGGTAAACAACGTCGTCGTACTGGGCACCCAAATGGGGTGAACGAAGGTAAGGT  
AAGATCGTCGATCTCTGACTGAAACGGGCTAAATATGTTGTACGCTACCAGGGCGGTAC  
AACCGAGGCCATACTCTCGTAATCAACGGTAAAAAAACCGTTCTCCATCTTATTCCATCA  
GGTATTCTCCCGCGAGAATGTAACCAGCATCAGCTGGTAACGGTGTGCTGTCTCCGGCC  
GCGCTGATGAAAGAGATGAAAGAACTGGAAGACCGTGCGATCCCCGTTCTGTGACCGTCTG  
CTGCTGTCTGAAGCATGTCGCTGATCCTTGATTATCACGTTGCGCTGGATAACCGCGGT  
GAGAAAGCCGCTGGCGCAAAGCGATCGGCACCACCGGTCGTGGTATCAGGGCTGCTTAT  
GAAGATAAAAGTAGCACGTCGCGGTCTGCGTGTGGCACCCTTTCGACAAAGAAACCTTC  
GCTGAAAACGTAAAGAAGTGTGAAATATCACAACTTCCAGTGGTTAACTACTACAAA  
GCTGAAGCCGTTGATTACAGAAAAGTTCTGGATGATACGATGGCTGTTGCCGACATCCTG  
ACTTCTATGGTGGTTGACGTTCTGACCTGCTCGACCAGGCGCGTACGGTGGCGATTTG  
GTCATGTTGAAGGTGCGCAGGGTACGCTGCTGGATATCGACCAACGGTACTTATCCGTAC  
GTAACCTCTCCAACACCACTGCTGGTGGCGACCGGTTCCGGCTGGGCCCGCGT  
TATGTTGATTACGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCCACTCGTGTAGGTGCAGGTCCG  
TTCCCGACCGAACTGTTGATGAAACTGGCGAGTTCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTG  
GGCGCAACTACGGGGCGTCGTCGTACCGGCTGGCTGGACACCGTTGCCGTTCGTGT  
GCGGTACAGCTGAACTCCCTGCTGGCTCTGCCGTGACTAAACTGGACGTTGGATGGC  
CTGAAAGAGGTTAAACTCTGCGTGGCTACCGTATGCCGGATCGTCGCGAAGTGAATACC  
ACTCCGCTGGCAGCTGACGACTGGAAGGTGTAGAGCCGATTACGAAACCATGCCGGC  
TGGTCTGAATCCACCTTCGGCGTGAAGAGATCGTAGCGGCCCTGCCGAGGCCGCGCTGAAC  
TATATCAAGCGTATTGAAGAGCTGACTGGTGTGCCGATCGATATCATCTACCGATCCG  
GATCGTACTGAAACCATGATTCTGCGCACCCTGACGGTggatcc-BamHI

Fig. 2

3/5

MGNVVVLGTQWGDEGKGKIVDLLTERAKYVVRVQGGHNAGHTLVINKEKTVLHLIPSGILR  
ENVTSIIGNGVVLSPAALMKEMLKELEDRGIPVRERLLLSEACPLILDYHVALDNAREKARGA  
KAIGTTGRGIGPAYEDKVARRGLRVGDLFDKETFAEKLKEVMEYHNFQLVNYYKAEAVDYQK  
VLDDTMMAVADILTSMVVDVS DLLDQARQRGDFVMFEGAQGTLLIDHGTYPYVTSSNTTAGG  
VATGSGLGPRYVDYVLGILKAYSTRVGAGPFPTELFDETGEFLCKQGNEFGATTGRRRTGW  
LDTVAVRRAVQLNSLSGFCLTKLDVLDGLKEVKLCVAYRMPDGREVTTTPLAADDWKGVEPI  
YETMPGWSESTFGVKDRSGLPQAALNYIKRIEELTGVPIDIISTDPPRTETMILRDPPFDA

Fig. 3

ASS E. coli Oligo 5': aaggatccatgggttaacaacgtcgctgtactgg  
ASS E. coli Oligo 3': aaggatcccgtaccagaattacg

Fig. 4

4/5

## PTP09

KpnI

GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCCCTTCTCTCACTTTTCCGGC  
CTTAAATCCAATCCAATATCACCACTCCGCCCGTACTCCTTCCGCCGCCGCC  
GCCGCCGTGTAAGGTACCCGGCGATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAAGAGAAA  
ACTGAGACTTCGGGATCC

BamHI

## PTP10

KpnI

GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCCCTTCTCTCACTTTTCCGGC  
CTTAAATCCAATCCAATATCACCACTCCGCCCGTACTCCTTCCGCCGCCGCC  
GCCGCCGTGTAAGGTACCCGGCGATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAAGAGAAA  
ACTGAGACTTCGGCTGGATCC

BamHI

## PTP11

KpnI

GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCCCTTCTCTCACTTTTCCGGC  
CTTAAATCCAATCCAATATCACCACTCCGCCCGTACTCCTTCCGCCGCCGCC  
GCCGCCGTGTAAGGTACCCGGCGATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAAGAGAAA  
ACTGAGACTTCGGGGATCC

BamHI

Fig. 5

5/5

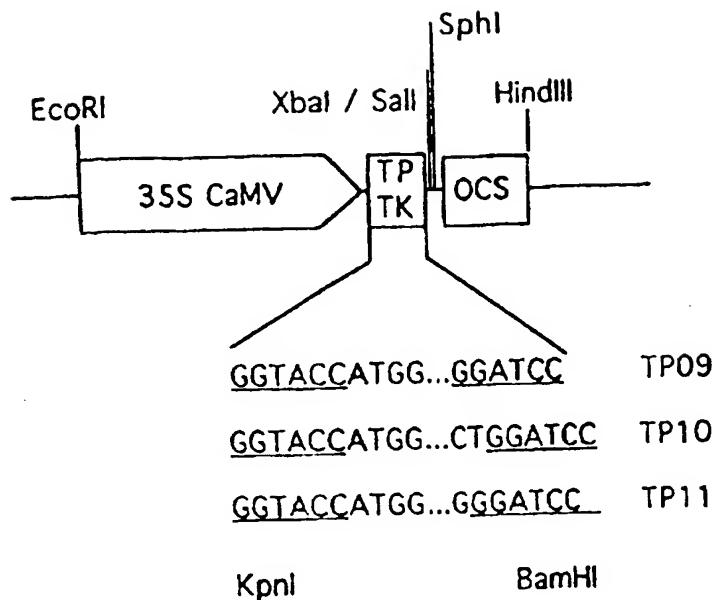


Fig. 6

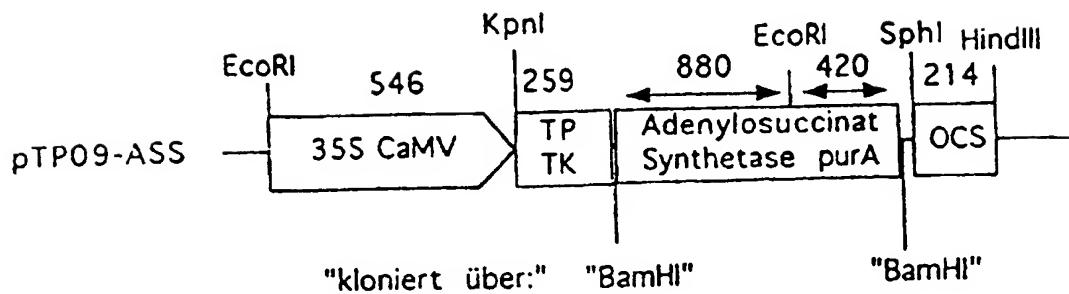


Fig. 7



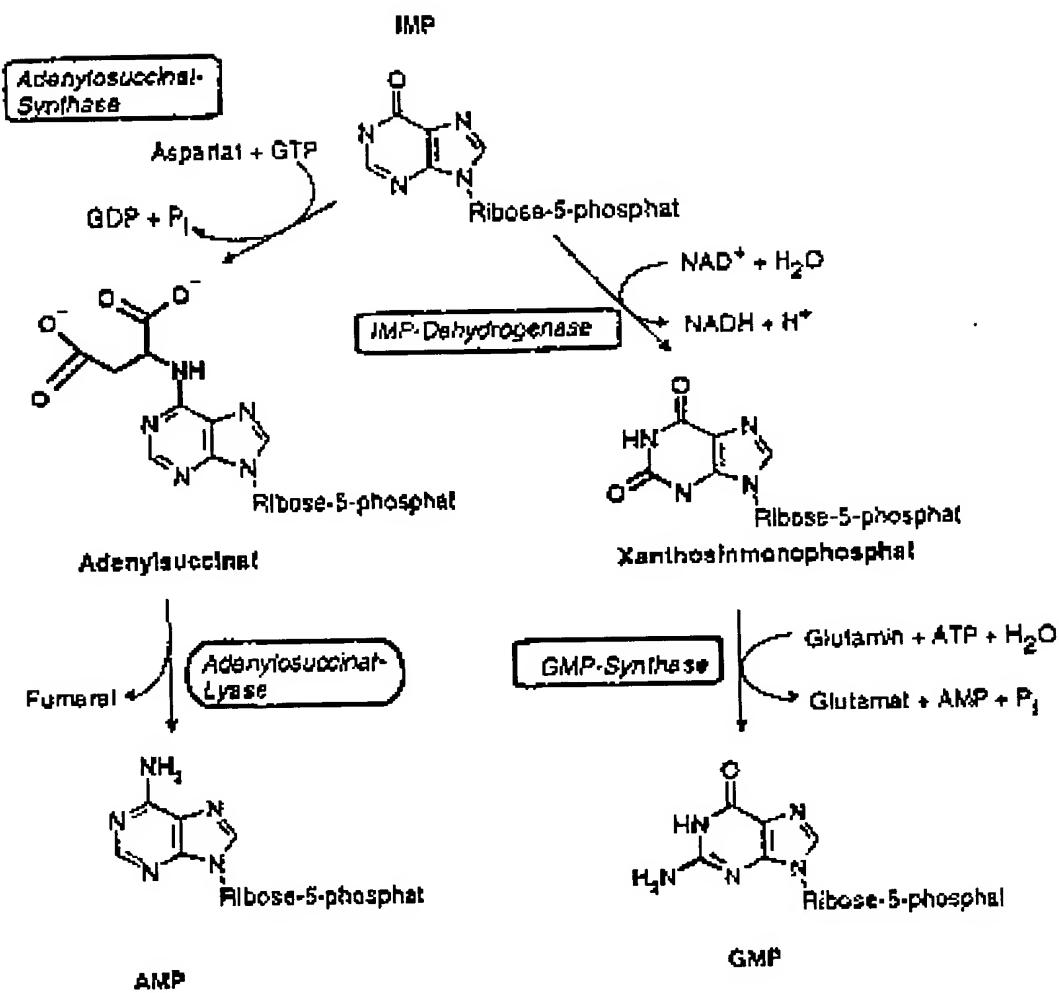


Fig. 1

BamHI-

ggatccATGGGTAACAACGTGGTGTACTGGGCACCCAAATGGGGTGACGAAGGTAAAGGT  
AAAGATCGTCGATCTTCTEACTGAAACGGGCTAAATATGTTGTACGCTACCAGGGGGTCAC  
AACCCAGGCCATACTCTCGTAATCAACGGTAAAAAAACCGTCTCCATCTTATTCCATCA  
GGTATTCTCCGGAGAAATGTAACCAGCATCAGGTAAACGGTGTGTOCTGTCCTGGCC  
GGCGCTGATGAAAAGAGATGAAAAGAAGTGGAAAGACCGTGGCATCCCCGTTGGTACCGTCTG  
CTGCTGTCTGAAAGCATGTCGGCTGATCCTTGTATCACGGTGGCTGGATAACGGCGGT  
GAGAAAGCGCGTGGCCCGAAAGCGATCGGCACCACCGGTCGTGGTACCGGCTGCTTAT  
GAGATATAAGTACCAACGTCGGGTCTGCGTGTGGGACCTTTGGACAAAGAAGACCTTC  
GCTGAAAAGACTGAAAAGRAAGTGTGGAAATATCACAAACTTCCAGTTGGTAACTACTACAAA  
GCTGAAAGCGGTTGATTAAACGAAAAGTTCTGGATGATAACGATGGCTGTTGGGACATCCTG  
ACTTCATACTGGTGGTTGACGTTCTGACCTGCTCGACCAAGGCGCTCAGCGTGGCGATTTC  
GTCATGTTGAAAGGTGGCCAGGGTACGCTGCTGGATATGACCAACGGTACTTATCCGTAC  
GTAACCTCTTCAAACACCAACTCTGGTGGCTGGCCACCGGTTGGGCTGGGCCCTGGGCCGCGT  
TATGTTGATTACGTTCTGGGTATCTCAAAAGCTTACTCCACTCGTGTAGGTGCAGGTCCG  
TTCCCACCGAAACTGTTGAAACTGGCGAGTTCTCTGCAAGCAGGGTAACGAATTG  
GGCGCAACTACGGGGCGTGTGCGTACCGGCTGGCTGGACACCGTTGGCGTTCTGCGT  
GGCGTACAGCTGAACTCCCTGCTGGCTCTGCGCTGACTAAACTGGCACGTTCTGATGGC  
CTGAAAAGAGGTAAACTCTGCGTGGCTTACCGTATGCCGGATCGTGGCGAAGTGAATACG  
ACTCGCTGGCAGCTGACCGACTGAAAGCTGAGAGGCCGATTTACGAAACCATGCCGGG  
TGGCTGAAATCCACCTTEGGCGTGAAGAGATCGTAGCGGCTGGCCGAGGGGGCGTGAAC  
TATATCAAGCGTATTGAAAGAGCTGACTGGTGTGCCGATCGATATCGATCTCTAACCGATCCG  
GATCGTACTGAAACCATGATTCTGCGCGACCCGTTGACGCGT**Aggtcc-BamHI**

Fig. 2

3/5

MGNVVVVLGTQWGDEGRGKIVDLLTERAKYVVRYQQGHNAAGHTLIVINGEKTVLKLIPSGILR  
ENVTSIIGNGVVLSPAALMKEMKELEDRGIPVRERLLLSEACPLILDYHVALDNAREKARGA  
KAIGTTGRGIGPAYEDKVARRQLRVGDLFDKETFAEKLKEVMEYHNQQLVNYYKAEAVDYQK  
VLDCTMAVADILTSVVVDVSDLLDQARQRQDFVMPEGAQGTLLDIDHGTYPYVTSSNTTACG  
VATGSGICGPRYVDYVLGILKAYSTRVGAGPFPTELFDETGEPLCKQGNFGATTGRRRTGW  
LDTVAVRRRAVQLNSLSGFCLTKLDVLDGLKEVKLCVAYRMPDCREVTTPLAADDWKGVEPI  
YETMPGWSESTFGVKDRSGLPQAALNYIKRIEELTGVPIDIISTDPERTETMILRDPFDA

Fig. 3

ASS E. coli Oligo 5': aaggatccatgggttaacaaacgtcgccgtactgg  
ASS E. coli Oligo 3': aaggatcccgtaaccagaattacg

Fig. 4

4/5

## PTP09

KpnI

GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTCTGTC  
 CCTCGCCATGGCTCTGCCCTTTCTCAACTTTCCCTTCTCTCACTTTTCCGGC  
 CTTAAATCCAATCCCAATATCACCACTCCCCGGCCGTACTCCTCCCTCCGGCC  
 GCCGCCGTGTAAGGTCAACCGGGGATTCTGTGCCTCAGCTGCAACCGAACCATA  
ACTGAGACTGCGGAA

BamHI

## PTP10

KpnI

GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTCTGTC  
 CCTCGCCATGGCTCTGCCCTTTCTCAACTTTCCCTTCTCTCACTTTTCCGGC  
 CTTAAATCCAATCCCAATATCACCACTCCCCGGCCGTACTCCTCCCTCCGGCC  
 GCCGCCGTGTAAGGTCAACCGGGGATTCTGTGCCTCAGCTGCAACCGAACCATA  
ACTGAGACTGCGGAT

BamHI

## PTP11

KpnI

GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTCTGTC  
 CCTCGCCATGGCTCTGCCCTTTCTCAACTTTCCCTTCTCTCACTTTTCCGGC  
 CTTAAATCCAATCCCAATATCACCACTCCCCGGCCGTACTCCTCCCTCCGGCC  
 GCCGCCGTGTAAGGTCAACCGGGGATTCTGTGCCTCAGCTGCAACCGAACCATA  
ACTGAGACTGCGGAA

BamHI

Fig. 5

5/5

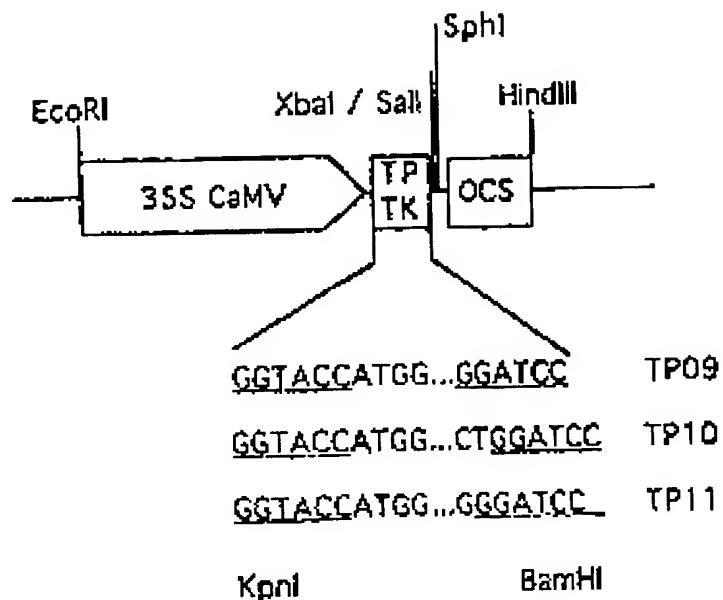


Fig. 6

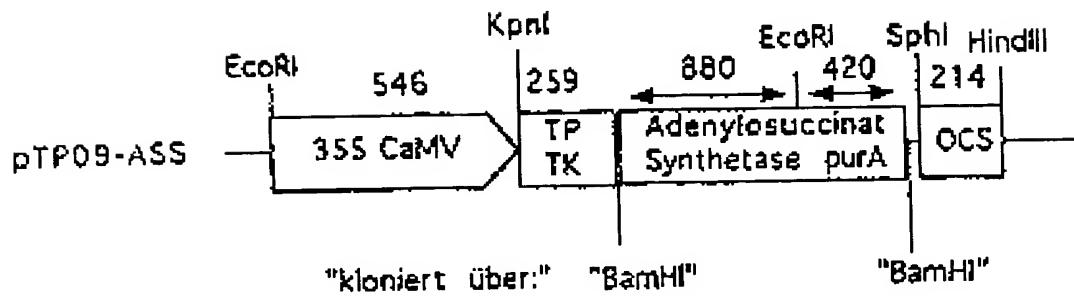


Fig. 7



**PCT**  
 WELT-ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<b>(51) Internationale Patentklassifikation<sup>6</sup>:</b> <b>C12N 9/00, 15/52, 15/82, 15/62, C12Q 1/68, A01H 5/00</b>	<b>A3</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 98/10074</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> <b>12. März 1998 (12.03.98)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> <b>PCT/EP97/04812</b> <b>(22) Internationales Anmelde datum:</b> <b>4. September 1997 (04.09.97)</b>		
<b>(30) Prioritätsdaten:</b> <b>196 35 917.1      4. September 1996 (04.09.96)      DE</b>		
<b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).		
<b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> LERCHL, Jens [DE/DE]; Im Steg 36, D-68526 Ladenburg (DE). SCHMIDT, Ralf-Michael [DE/DE]; Gräfensteinstrasse 14, D-67434 Neustadt (DE). SCHIFFER, Helmut [DE/DE]; Theodor-Heuss-Strasse 31, D-67112 Mutterstadt (DE). SONNEWALD, Uwe [DE/DE]; Martha-Brautzsch-Strasse 7a, D-06467 Hoym (DE). BADUR, Ralf [DE/DE]; Blechenstedter Strasse 7, D-31137 Hildesheim (DE).		
<b>(74) Anwälte:</b> KINZEBACH, Werner usw.; Reitstötter, Kinzebach & Partner, Postfach 86 06 49, D-81633 München (DE).		

**(54) Title:** ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE

**(54) Bezeichnung:** ADENYLOSUCCINAT SYNTHETASE

**(57) Abstract**

Expression cartridges are disclosed which confer to plants, plant cells, tissues or parts a resistance against inhibitors of the vegetable adenylosuccinate synthetases. Also disclosed is the use of the expression cartridges in appropriate vectors to transform plants, plant cells, tissues or parts.

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft Expressionskassetten, die in Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen Resistenz gegenüber Inhibitoren pflanzlicher Adenylosuccinat Synthetasen vermitteln sowie die Verwendung der Expressionskassetten in geeigneten Vektoren zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern	Application No
PCT/EP	94812

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N9/00 C12N15/52 C12N15/82 C12N15/62 C12Q1/68  
A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N C12Q A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 512 260 A (AMERICAN CYANAMID CO) 11 November 1992 page 3 and page 11 ---	1,3-6
X	WOLFE S A ET AL: "NUCLEOTIDE SEQUENCE AND ANALYSIS OF THE PURA GENE ENCODING ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE OF ESCHERICHIA COLI K12" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 263, no. 35, 15 December 1988, pages 19147-19153, XP002054711 see the whole document ---	1,3-6
X	GB 2 197 653 A (JEFFERSON RICHARD ANTHONY) 25 May 1988 pages 6,7,36-38,; fig. 9 ---	21,24 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 June 1998	29.06.98
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Holtoff, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inten  
nal Application No  
PCT/EP 97/04812

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 19576 A (CIBA GEIGY AG) 27 June 1996 see page 7 ---	1-20
A	EP 0 723 017 A (BASF AG) 24 July 1996 cited in the application see page 3, line 10 ---	1-24
A	FONNE-PFISTER R ET AL: "THE MODE OF ACTION AND THE STRUCTURE OF A HERBICIDE IN COMPLEX WITH ITS TARGET: BINDING OF ACTIVATED HYDANTOCIDIN TO THE FEEDBACK REGULATION SITE OF ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 93, no. 18, 3 September 1996, pages 9431-9436, XP002054712 see page 9436 ---	1-20
A	SIEHL D L ET AL: "ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE: SITE OF ACTION OF HYDANTOCIDIN, A MICROBIAL PHYTOTOXIN" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 110, no. 3, March 1996, pages 753-758, XP002054713 see the whole document ---	1-20
A	WO 88 02402 A (CALGENE INC) 7 April 1988 see the whole document ---	21-24
A	GUERINEAU F ET AL: "AN EXPRESSION CASSETTE FOR TARGETING FOREIGN PROTEINS INTO CHLOROPLASTS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 16, no. 23, 9 December 1988, page 11380 XP000006780 see the whole document -----	21-24

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
**PCT/EP 97/04812****Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**See Additional Matter**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found the present international application to comprise several (groups of) inventions, namely:

1. Claims: 1 - 20

The provision of expression cartridges comprising nucleotide sequences coding for non-plant adenylosuccinate synthetases (ADSS) and conferring resistance against inhibitors of plant ADSS enzymes; as well as the fusion of non-plant ADSS genes with the chloroplast-specific transit peptide of transketolase, use of the vector in producing herbicide-resistant, transgenic plants and use of the vector as selection and marker gene in transgenic plants.

2. Claims: 21 - 24

Expression kit for expressing foreign genes in plants, containing at least three cartridges which by inserting or deleting nucleotides shift the reading frame for the foreign gene located downstream by one or two nucleotides.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 04812

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
EP 0512260	A 11-11-1992	AU 654347 B AU 1595992 A CA 2067862 A FI 921940 A JP 5192161 A			03-11-1994 05-11-1992 04-11-1992 04-11-1992 03-08-1993
GB 2197653	A 25-05-1988	US 5432081 A US 5599670 A US 5268463 A			11-07-1995 04-02-1997 07-12-1993
WO 9619576	A 27-06-1996	US 5519125 A US 5688939 A AU 4342896 A CA 2207024 A EP 0813599 A FI 972549 A			21-05-1996 18-11-1997 10-07-1996 27-06-1996 29-12-1997 18-06-1997
EP 0723017	A 24-07-1996	DE 19501906 A CA 2167768 A			25-07-1996 24-07-1996
WO 8802402	A 07-04-1988	AU 620317 B AU 8079787 A EP 0285646 A JP 1501038 T			20-02-1992 21-04-1988 12-10-1988 13-04-1989

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04812

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES	IPK 6 C12N9/00 A01H5/00	C12N15/52	C12N15/82	C12N15/62	C12Q1/68
--	-------------------------	-----------	-----------	-----------	----------

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  
IPK 6 C12N C12Q A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 512 260 A (AMERICAN CYANAMID CO) 11.November 1992 Seite 3 und Seite 11 ---	1,3-6
X	WOLFE S A ET AL: "NUCLEOTIDE SEQUENCE AND ANALYSIS OF THE PURA GENE ENCODING ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE OF ESCHERICHIA COLI K12" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 263, Nr. 35, 15.Dezember 1988, Seiten 19147-19153, XP002054711 siehe das ganze Dokument ---	1,3-6
X	GB 2 197 653 A (JEFFERSON RICHARD ANTHONY) 25.Mai 1988 pages 6,7,36-38.; fig. 9 ---	21,24
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17.Juni 1998

29-06- 1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Holtorf, S

## INTERNATIONALER PUBLISHERCHENBERICHT

Inter  
PCT/EP 97/04812

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 96 19576 A (CIBA GEIGY AG) 27.Juni 1996 siehe Seite 7 ---	1-20
A	EP 0 723 017 A (BASF AG) 24.Juli 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 3, Zeile 10 ---	1-24
A	FONNE-PFISTER R ET AL: "THE MODE OF ACTION AND THE STRUCTURE OF A HERBICIDE IN COMPLEX WITHITS TARGET: BINDING OF ACTIVATED HYDANTOCIDIN TO THE FEEDBACK REGULATION SITE OF ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 93, Nr. 18, 3.September 1996, Seiten 9431-9436, XP002054712 siehe Seite 9436 ---	1-20
A	SIEHL D L ET AL: "ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE: SITE OF ACTION OF HYDANTOCIDIN, A MICROBIAL PHYTOTOXIN" PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 110, Nr. 3, März 1996, Seiten 753-758, XP002054713 siehe das ganze Dokument ---	1-20
A	WO 88 02402 A (CALGENE INC) 7.April 1988 siehe das ganze Dokument ---	21-24
A	GUERINEAU F ET AL: "AN EXPRESSION CASSETTE FOR TARGETING FOREIGN PROTEINS INTO CHLOROPLASTS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 16, Nr. 23, 9.Dezember 1988, Seite 11380 XP000006780 siehe das ganze Dokument -----	21-24

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 97/04812**F Id I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr.  
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
  
3.  Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

**siehe Zusatzblatt**

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
  
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:	
1. Ansprüche: 1-20	
<p>Die Bereitstellung von Expressionskassetten, welche Nukleotidsequenzen umfassen, die für nicht-pflanzliche Adenylosuccinat Synthetasen (ADSS) kodieren und welche Resistenz gegenüber Inhibitoren von pflanzlichen ADSS Enzymen vermitteln; weiterhin die Fusion von nicht-pflanzlichen ADSS Genen mit dem chloroplasten-spezifischen Transitpeptid der Transketolase und die Verwendung des Vektors zur Herstellung von herbizidresistenten transgenen Pflanzen und Verwendung des Vektors als Selektions- und Markergen in transgenen Pflanzen.</p>	
2. Ansprüche: 21-24	
<p>Expressions-kit zur Expression von Fremdgenen in Pflanzen, enthaltend mindestens drei Kassetten, welche durch Insertion oder Deletion von Nukleotiden das Leseraster für das stromabwärts gelegene Fremdgen um jeweils ein bzw. zwei Nukleotide verschieben.</p>	

**INTERNATIONAHLER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

deutsches Aktenzeichen

PCT/EP 97/04812

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0512260 A	11-11-1992	AU	654347 B	03-11-1994
		AU	1595992 A	05-11-1992
		CA	2067862 A	04-11-1992
		FI	921940 A	04-11-1992
		JP	5192161 A	03-08-1993
-----				
GB 2197653 A	25-05-1988	US	5432081 A	11-07-1995
		US	5599670 A	04-02-1997
		US	5268463 A	07-12-1993
-----				
WO 9619576 A	27-06-1996	US	5519125 A	21-05-1996
		US	5688939 A	18-11-1997
		AU	4342896 A	10-07-1996
		CA	2207024 A	27-06-1996
		EP	0813599 A	29-12-1997
		FI	972549 A	18-06-1997
-----				
EP 0723017 A	24-07-1996	DE	19501906 A	25-07-1996
		CA	2167768 A	24-07-1996
-----				
WO 8802402 A	07-04-1988	AU	620317 B	20-02-1992
		AU	8079787 A	21-04-1988
		EP	0285646 A	12-10-1988
		JP	1501038 T	13-04-1989
-----				